

# 基于肺泡巨噬细胞 M2 极化的麻黄-大黄药对治疗急性肺损伤的作用机制研究

王旭红<sup>1</sup>, 闫曙光<sup>2</sup>, 惠 毅<sup>2</sup>, 史 捷<sup>1\*</sup>, 李京涛<sup>3\*</sup>

1. 陕西中医药大学附属医院 呼吸科, 陕西 咸阳 712000

2. 陕西中医药大学基础医学院, 陕西 咸阳 712046

3. 陕西中医药大学附属医院 感染科, 陕西 咸阳 712000

**摘要:**目的 探讨麻黄-大黄药对对急性肺损伤(acute lung injury, ALI)大鼠肺泡替代激活的巨噬细胞(alternatively activated macrophages, M2)极化的调控作用及其机制。方法 Wistar 大鼠随机分为对照组、模型组及麻黄-大高低、中、高剂量(2.2、4.4、8.8 g/kg)组和地塞米松(5 mg/kg)组,大鼠 ip 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)制备 ALI 模型,造模后立即给予药物进行干预,采用苏木素-伊红(HE)染色法观察肺组织病理变化;采用免疫荧光双标法检测肺泡巨噬细胞标记物 F4/80 和 M2 标记物 CD206,以及 F4/80 和白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)的共表达;采用流式细胞术检测肺组织 F4/80 和 CD206 阳性巨噬细胞数量的变化;采用 qRT-PCR 法检测肺组织中精氨酸酶-1(arginase-1, Arg-1)和 IL-10 mRNA 表达;采用 Western blotting 法检测肺组织中 Arg-1 和 IL-10 蛋白表达。结果 与对照组比较,模型组大鼠肺组织肺泡结构破坏,肺间质水肿增厚,炎性细胞聚集、浸润,其中巨噬细胞数量显著增多;免疫组化和流式细胞术检测结果证实,肺泡巨噬细胞数量增多、表达增强,M2 巨噬细胞表达增强、数量增多;M2 肺泡巨噬细胞相关细胞因子 IL-10 和 Arg-1 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高( $P < 0.01$ )。与模型组比较,麻黄-大黄高、中剂量组肺组织病理状态明显改善,肺组织 M2 肺泡巨噬细胞数量进一步升高,抗炎因子 IL-10 和促修复因子 Arg-1 蛋白和 mRNA 表达均显著上调( $P < 0.01$ )。结论 麻黄-大黄药对可促进肺泡巨噬细胞 M2 极化,增加抗炎因子激活和释放,抑制炎症反应,从而治疗急性肺损伤。

**关键词:**麻黄-大黄药对;急性肺损伤;肺泡巨噬细胞;M2 极化;炎症反应

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)09-2715-08

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.09.014

## Mechanism of *Ephedrae Herba-Rhei Radix et Rhizoma* drug pair on treating acute lung injury based on alveolar macrophage M2 polarization

WANG Xu-hong<sup>1</sup>, YAN Shu-guang<sup>2</sup>, HUI Yi<sup>2</sup>, SHI Jie<sup>1</sup>, LI Jing-tao<sup>3</sup>

1. Department of Respiratory, Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712000, China

2. College of Basic Medicine, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

3. Department of Infectious Disease, Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712000, China

**Abstract: Objective** To investigate the regulatory effect and mechanism of Mahuang (*Ephedrae Herba*)-Dahuang (*Rhei Radix et Rhizoma*) drug pair (MD) on polarization of alternatively activated macrophages (M2) in rats with acute lung injury (ALI). **Methods** Wistar rats were randomly divided into control group, model group, MD low-, medium-and high-dose (2.2, 4.4, 8.8 g/kg) groups and dexamethasone (5 mg/kg) group. Lipopolysaccharide (LPS) was used to prepare ALI model, and drug intervention was given immediately after modeling, and hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of lung tissue;

收稿日期: 2022-01-08

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(81703974);陕西省自然科学基金面上项目(2021JM-473);陕西中医药大学学科创新团队建设(2019-YL05)

**作者简介:**王旭红(1981—),男,主治医师,硕士,研究方向为中医药治疗呼吸系统疾病的基础与临床研究。

Tel: 15829448148 E-mail: doctorwangxh@163.com

**\*通信作者:**史 捷(1978—),女,主任医师,研究方向为中医药治疗呼吸系统疾病的基础与临床研究。E-mail: 2780067265@qq.com

李京涛(1980—),男,主任医师,教授,硕士生导师,研究方向为中医药治疗感染性疾病的基础与临床研究。

E-mail: Lijingtao555@163.com

Immunofluorescence double-labeling method was used to detect alveolar macrophage marker F4/80 and M2 marker CD206, as well as the co-expression of F4/80 and interleukin-10 (IL-10); Flow cytometry was used to detect the changes in number of F4/80 and CD206 positive macrophages in lung tissue; Arginase-1 (*Arg-1*) and *IL-10* mRNA expressions in lung tissue were detected by qRT-PCR; Arg-1 and IL-10 protein expressions in lung tissue were detected by Western blotting. **Results** Compared with control group, alveolar structure in lung tissue of rats in model group was destroyed, pulmonary interstitial edema was thickened, inflammatory cells were aggregated and infiltrated, and number of macrophages was significantly increased; The results of immunohistochemistry and flow cytometry confirmed that number and expression of alveolar macrophages were increased, expression and number of M2 macrophages were increased; mRNA and protein expressions of M2 alveolar macrophage-related cytokines IL-10 and Arg-1 were significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with model group, pathological state of lung tissue in MD high- and medium-dose groups were significantly improved, number of M2 alveolar macrophages in lung tissue was further increased, protein and mRNA expressions of anti-inflammatory factor IL-10 and pro-repair factor Arg-1 were significantly up-regulated ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** MD can promote M2 polarization of alveolar macrophages, increase the activation and release of anti-inflammatory factors, and inhibit the inflammatory response, thereby treating ALI.

**Key words:** *Ephedrae Herba-Rhei Radix et Rhizoma* drug pair; acute lung injury; alveolar macrophage; M2 polarization; inflammation response

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是由病毒、细菌、感染等因素诱发的肺组织免疫炎症性疾病, 由于免疫细胞的过度活化, 炎症反应失控, 形成炎症因子风暴, 进而损伤血管内皮细胞和肺泡上皮细胞, 造成肺组织通/换气功能障碍<sup>[1]</sup>。在众多的免疫细胞中, 肺组织巨噬细胞参与了炎症的发生、发展全过程。肺组织巨噬细胞长期存在于肺中, 是肺局部炎症微环境和炎症反应最重要的调节细胞, 主要包括肺泡巨噬细胞、肺间充质巨噬细胞、支气管巨噬细胞等, 其中肺泡巨噬细胞所占比例大于 90%, 是肺内巨噬细胞发挥生物活性的主体<sup>[2]</sup>。研究表明, 肺泡巨噬细胞极化失衡是导致炎症反应加剧和 ALI 发生发展的重要原因之一, 巨噬细胞根据环境刺激反应的不同, 可被激活为经典激活的巨噬细胞 (classically activated macrophages, M1) 和替代激活的巨噬细胞 (alternatively activated macrophages, M2), 被称为巨噬细胞的 M1/M2 型极化<sup>[3]</sup>。M1 型巨噬细胞以吞噬杀菌、释放炎症因子、促炎作用为主, M2 型巨噬细胞以释放抗炎因子、抑制炎症反应、促进组织修复功能为主。在炎症反应过重时促进肺泡巨噬细胞 M2 型极化能有效地抑制炎症反应, 阻止 ALI 的发展<sup>[4]</sup>。

肺肠合治是中医药治疗 ALI 的临床常用治法, 麻黄-大黄是体现肺肠合治法的主要药对, 多个以麻黄-大黄为核心药物的方药被临床和实验证实对 ALI 疗效确切<sup>[5-7]</sup>。已有研究表明麻黄、大黄能抑制巨噬细胞 M1 极化, 在哮喘和脓毒血症的治疗中发挥抗炎作用<sup>[8-10]</sup>。目前麻黄-大黄药对是否能够通过

促进肺泡巨噬细胞 M2 极化抑制炎症反应, 从而防治 ALI 尚不清楚。因此, 本研究采用 ip 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 制备 ALI 大鼠模型, 考察麻黄-大黄药对抑制炎症反应、干预肺泡巨噬细胞 M2 极化的作用。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠, 体质量 ( $250 \pm 20$ ) g, 8 周龄, 购自成都达硕实验动物有限公司, 合格证号 SCXK (川) 2020-030。动物饲养于陕西中医药大学实验动物中心 SPF 级动物房, 自由进食饮水。动物实验经陕西中医药大学实验动物伦理委员会审查批准 (批准号 2020DW-011-09)。

### 1.2 药品与试剂

大黄免煎颗粒 (批号 20120030)、麻黄免煎颗粒 (批号 20020037) 购自四川新绿色科技发展有限公司; 地塞米松注射液 (批号 20200902, 5 mg/mL) 购自重庆市先锋动物药业有限公司; LPS (批号 065M8209V) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司;  $\beta$ -actin 抗体 (批号 AF1627)、F4/80 抗体 (批号 30325T) 购自美国 CTS 公司; CD206 抗体 (批号 sc-376012)、白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10) 抗体 (批号 sc-365858) 购自 Santa crus 公司; 精氨酸酶-1 (arginase-1, Arg-1) 抗体 (批号 DF6657) 购自 Affinity 公司; 荧光 FITC 标记的 IgG 抗体 (批号 BA1101)、荧光 Cy3 标记的 IgG 抗体 (批号 BA1032) 购自武汉博士德生物工程有限公司; APC 标记 F4/80 抗体 (批号 123116)、PE 标记 CD206 抗体 (批号 141705)

购自 Biolegend 公司。

### 1.3 仪器

全自动高压灭菌器(日本三洋公司); RM 2016 型病理切片机(德国 Leica 公司); JK-6 型组织摊烤片机、JT-12J 型脱水机(武汉俊杰公司); HI650 型离心机(湖南湘仪实验室仪器有限公司); C2500-R-230V 型微型高速离心机(美国 Labnet 公司); DYCZ-40 型电转仪(北京六一仪器厂); ECLIPSE Ts2 型倒置显微镜(日本 Nikon 公司); cytoFLEX 流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司); EDC-810 型 qRT-PCR 系统(东胜创新生物科技有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 药物的制备

麻黄 9 g、大黄 12 g 为成人每次给药剂量,成人按 60 kg 体质量计算,动物给药剂量根据成人与大鼠体质量换算,确定大鼠的等效剂量为 2.2 g/kg,本研究中麻黄-大黄药对的低、中、高剂量组对应的剂量分别为 2.2、4.4、8.8 g/kg。麻黄-大黄免煎颗粒溶于蒸馏水中,分别配制成质量浓度为 1.1、2.2、4.4 g/mL 的混悬液。

### 2.2 动物分组、造模及给药

60 只 Wistar 大鼠随机分为对照组、模型组、麻黄-大黄低、中、高剂量(2.2、4.4、8.8 g/kg)组和地塞米松(5 mg/kg)组,每组 10 只。除对照组外,其余各组大鼠 ip LPS (10 mg/kg) 制备 ALI 模型<sup>[11]</sup>,造模后各给药组立即 ig 2 mL 相应药物,对照组和模型组 ig 等体积生理盐水,每 8 小时 1 次,连续 3 次。末次给药 8 h 后,大鼠 ip 25%戊巴比妥麻醉处死,取肺组织备用。

### 2.3 麻黄-大黄对 ALI 大鼠肺组织病理的影响

取各组大鼠肺组织,固定于 4%多聚甲醛中,梯度乙醇脱水,透明,石蜡包埋,石蜡切片(3~4  $\mu$ m),二甲苯脱蜡,梯度乙醇复水;进行苏木素-伊红(HE)染色,于显微镜下观察并拍照。

### 2.4 免疫荧光双标检测肺组织肺泡巨噬细胞表面标记物 F4/80 和 M2 肺泡巨噬细胞表面标记物 CD206、IL-10 的表达

取各组大鼠肺组织石蜡切片,脱蜡,梯度乙醇复水,加入枸橼酸缓冲液加热进行抗原修复;加入一抗 F4/80 (1:100),于 4  $^{\circ}$ C 湿盒中避光孵育 15 h;加入荧光二抗染色(红色),加入血清封闭后,加入一抗 CD206 (1:100)、IL-10 (1:50),于 4  $^{\circ}$ C 湿盒中避光孵育 15 h,加入荧光二抗染色(绿色),复

染核,封片,于显微镜下观察并采集图像。

### 2.5 流式细胞术检测肺组织 F4/80 标记的肺泡巨噬细胞和 CD206 标记的 M2 肺泡巨噬细胞百分比

取各组大鼠肺组织,剪碎后加入 0.5%胶原酶和 0.25%胰酶,于 37  $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 2~3 h,将肺组织悬液滤过、离心、清洗、重悬得到细胞,收集细胞,计数,分别加入 F4/80 (0.125 mg/test) 和 CD206 (0.125 mg/test), 4  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, 1500 r/min 离心 5 min, 避光孵育 50 min; 加入工作液,采用流式细胞仪检测分析。

### 2.6 qRT-PCR 检测肺组织 IL-10 和 Arg-1 mRNA 表达

取各组大鼠肺组织 100 mg,加入组织裂解液制成匀浆,Trizol 法提取总 RNA,并测定纯度和浓度。按照反转录试剂盒说明书合成 cDNA,进行 qRT-PCR 分析。反应体系为 20  $\mu$ L,PCR 扩增程序:90  $^{\circ}$ C 循环预变性 30 s; 95  $^{\circ}$ C 变性 5 s; 60  $^{\circ}$ C 退火延伸 34 s,共设定 40 个循环。相对定量法计算各指标 mRNA 的  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  值。引物序列由北京擎科生物有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

| 基因           | 序列 (5'-3')                                               | 产物大小/bp |
|--------------|----------------------------------------------------------|---------|
| <i>GAPDH</i> | F: ATGGGTGTGAACCACGAGA<br>R: CAGGGATGATGTTCTGGGCA        | 229     |
| <i>IL-10</i> | F: GCTGGACAACATACTGCTAACCG<br>R: CACAGGGGAGAAATCGATGACAG | 218     |
| <i>Arg-1</i> | F: ATCGTGTACATTGGCTTGCG<br>R: CGTCGACATCAAAGCTCAGG       | 184     |

### 2.7 Western blotting 检测肺组织 IL-10 和 Arg-1 蛋白表达

取各组大鼠肺组织,加入裂解液匀浆,裂解 30 min。采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质质量浓度,蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,封闭后分别加入 IL-10 (1:1000)、Arg-1 (1:1000)、 $\beta$ -actin (1:500) 特异性抗体,4  $^{\circ}$ C 孵育过夜;PBST 洗涤后,加入 HRP 标记的二抗 (1:5000),37  $^{\circ}$ C 摇床孵育 2 h,显影并扫描胶片。采用 Image-J 凝胶分析软件定量条带强度,以  $\beta$ -actin 作为内参计算蛋白相对表达量。

### 2.8 统计学分析

采用 Graph Pad Prism 7 软件进行数据分析,实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析 (One way-ANOVA)。

### 3 结果

#### 3.1 麻黄-大黄对 ALI 大鼠肺组织病理的影响

如图 1 所示, 对照组大鼠肺泡组织结构完整, 呈空腔状, 肺泡排列整齐, 周围间隙内无炎性细胞浸润; 模型组大鼠肺泡塌陷, 结构紊乱, 肺间质增厚、水肿, 间质内可见大量炎性细胞浸润, 气道狭窄并可见大量红细胞; 麻黄-大黄高、中剂量组大鼠肺泡结构部分恢复, 肺间质增厚与水肿减轻, 气道出血与炎性细胞浸润减少; 麻黄-大黄低剂量组大鼠肺组织仍然可以见炎性细胞浸润与气道出血, 肺间质水肿改变不明显, 但可见个别肺泡结构恢复; 地塞米松组大鼠肺泡结构部分恢复, 炎细胞浸润减少, 但仍可见肺间质水肿。

#### 3.2 免疫荧光双标检测肺组织肺泡巨噬细胞表面标记物 F4/80 和 M2 肺泡巨噬细胞表面标记物 CD206 的表达

如图 2 所示, 对照组大鼠肺组织偶见 F4/80 阳

性(红色)和 CD206 阳性(绿色)肺泡巨噬细胞表达; 模型组大鼠肺组织 F4/80 阳性和 CD206 阳性肺泡巨噬细胞数目增多, 荧光表达增强, 且部分 CD206 阳性细胞与 F4/80 阳性细胞共定位表达, 表明在急性肺损伤发生时, LPS 诱导肺泡巨噬细胞大量活化, 同时部分肺泡巨噬细胞向 M2 型极化, 呈现抗炎表型; 麻黄-大黄各剂量组和地塞米松组大鼠肺组织 F4/80 阳性肺泡巨噬细胞显著减少, 荧光强度减弱, CD206 阳性巨噬细胞则明显增多, 说明麻黄-大黄能够抑制肺泡巨噬细胞的活化, 同时促进其向 M2 极化。

#### 3.3 免疫荧光双标检测肺泡巨噬细胞表面标记物 F4/80 和抗炎因子 IL-10 的表达

如图 3 所示, 对照组大鼠肺组织可见 F4/80 阳性肺泡巨噬细胞(红色)和 IL-10(绿色)少量表达; 模型组大鼠肺组织 F4/80 阳性肺泡巨噬细胞数目增多, 荧光表达增强, 同时 IL-10 荧光表达也明显增

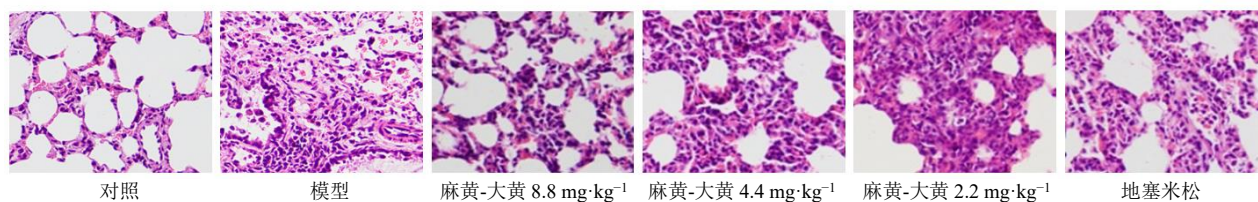


图 1 麻黄-大黄对 ALI 大鼠肺组织病理的影响 (HE,  $\times 400$ )

Fig. 1 Effect of *Ephedrae Herba-Rhei Radix et Rhizoma* on pathological changes of lung tissue in ALI rats (HE,  $\times 400$ )

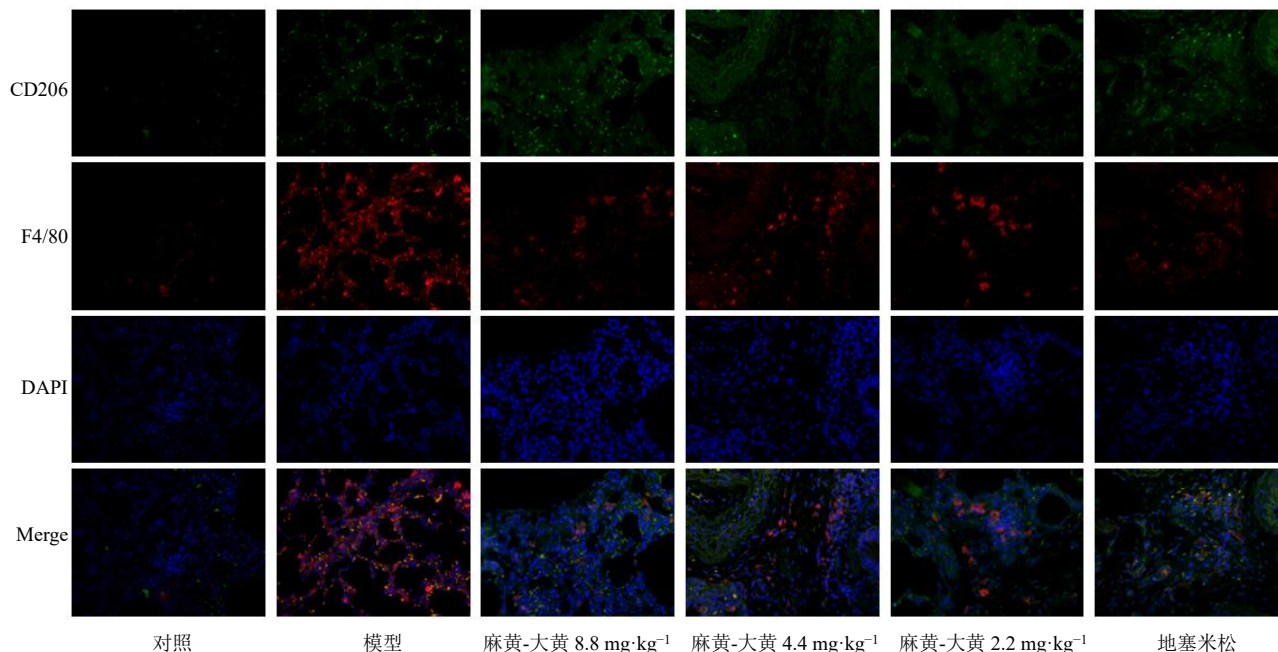


图 2 各组大鼠肺组织巨噬细胞表面标记物 F4/80 和 M2 巨噬细胞表面标记物 CD206 的表达 ( $\times 100$ )

Fig. 2 Expression changes of macrophage surface marker F4/80 and M2 macrophage surface marker CD206 in lung tissue of rats in each group ( $\times 100$ )



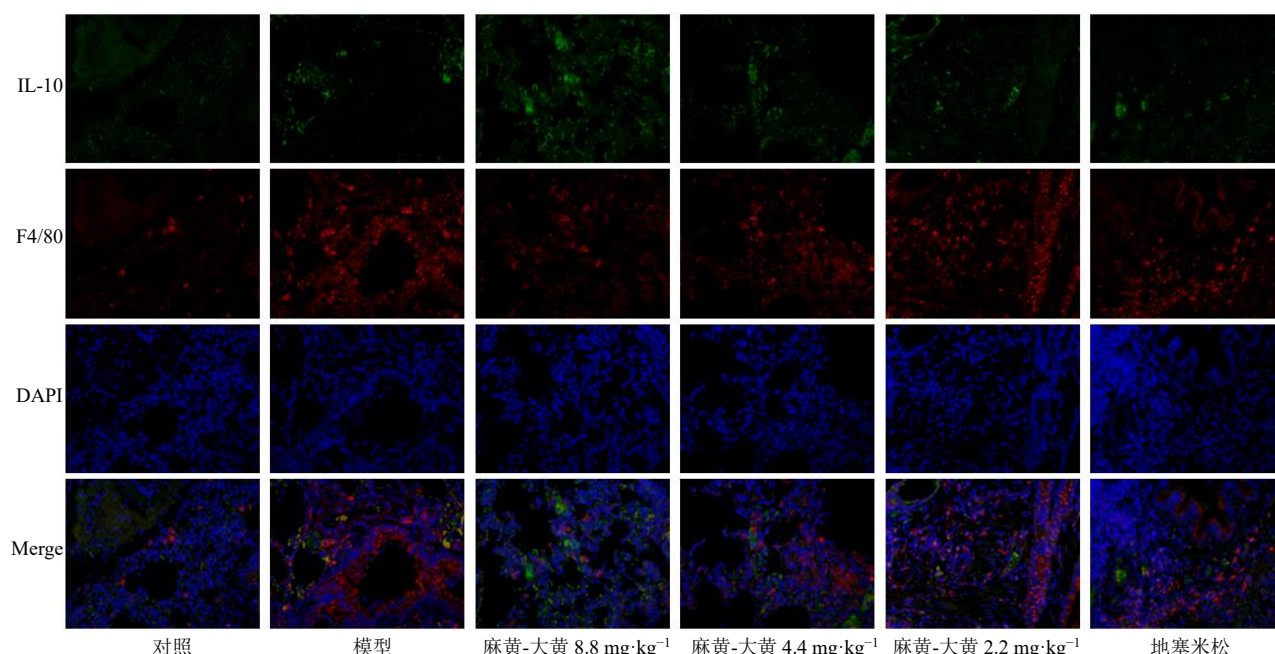


图 3 各组大鼠肺组织巨噬细胞表面标记物 F4/80 和炎症因子 IL-10 的表达变化 (×100)

Fig. 3 Expression changes of macrophage surface marker F4/80 and inflammatory factor IL-10 in lung tissue of rats in each group (×100)

强,且部分 IL-10 和 F4/80 呈共表达,IL-10 是由 M2 型巨噬细胞释放的抗炎因子,两者的共表达表明在 ALI 发生时,部分肺泡巨噬细胞会向 M2 型极化,同时释放抗炎因子以抑制炎症反应,减轻组织损伤;麻黄-大黄高、中剂量和地塞米松组大鼠肺组织 F4/80 阳性肺泡巨噬细胞减少,IL-10 表达进一步升高;麻黄-大黄低剂量组可见大量 F4/80 阳性肺泡巨噬细胞和少量的 IL-10 的共表达,说明麻黄-大黄高、中剂量药物能促进 M2 肺泡巨噬细胞激活并释放抗炎因子 IL-10,从而抑制炎症反应,缓解 ALI。

### 3.4 流式细胞检测肺组织 F4/80 标记的肺泡巨噬细胞和 CD206 标记的 M2 肺泡巨噬细胞百分比

如图 4 所示,与对照组比较,模型组大鼠肺组织 F4/80 标记的肺泡巨噬细胞百分比和 CD206 标记的 M2 肺泡巨噬细胞百分比均显著升高 ( $P<0.01$ );与模型组比较,各给药组肺组织 F4/80 标记的肺泡巨噬细胞百分比均显著降低 ( $P<0.01$ ),CD206 标记的 M2 肺泡巨噬细胞百分比均显著升高 ( $P<0.01$ ),进一步证实麻黄-大黄能够抑制肺泡巨噬细胞的激活,促进肺泡巨噬细胞 M2 极化。

### 3.5 qRT-PCR 检测肺组织 IL-10 和 Arg-1 mRNA 表达

如图 5 所示,与对照组比较,模型组大鼠肺组织抗炎因子 IL-10 和 Arg-1 mRNA 表达水平显著升

高 ( $P<0.01$ );与模型组比较,麻黄-大黄高、中剂量组大鼠肺组织 IL-10 和 Arg-1 mRNA 表达水平进一步升高 ( $P<0.01$ )。

### 3.6 Western blotting 检测肺组织 IL-10 和 Arg-1 蛋白表达

如图 6 所示,与对照组比较,模型组大鼠肺组织抗炎因子 IL-10 和 Arg-1 蛋白表达水平均显著升高 ( $P<0.01$ );与模型组比较,麻黄-大黄高、中剂量组大鼠肺组织 IL-10 和 Arg-1 蛋白表达水平进一步升高 ( $P<0.01$ )。表明麻黄-大黄能够促进肺泡巨噬细胞释放抗炎因子。

## 4 讨论

目前针对 ALI 的治疗,尚无疗效确切的药物,糖皮质激素类药物因其具有抗炎、抗内毒素、抑制免疫、抗休克及增强应激反应等药理作用,应用于 ALI 的治疗,尤其在新型冠状病毒肺炎导致的 ALI 中被广泛应用<sup>[12]</sup>。研究表明,地塞米松通过抑制巨噬细胞活化,在 LPS 诱导的炎症和 ALI 中发挥保护作用<sup>[13]</sup>。故本研究选用地塞米松为阳性对照药物,从肺泡巨噬细胞 M2 极化的角度来对比其与麻黄-大黄药对 ALI 的影响。巨噬细胞是免疫系统应对外界刺激的第一道防线,在病原微生物的吞噬、抗原提呈等方面发挥着重要的作用,当有病原微生物入侵时,肺组织的巨噬细胞被唤醒并募集循环中的巨

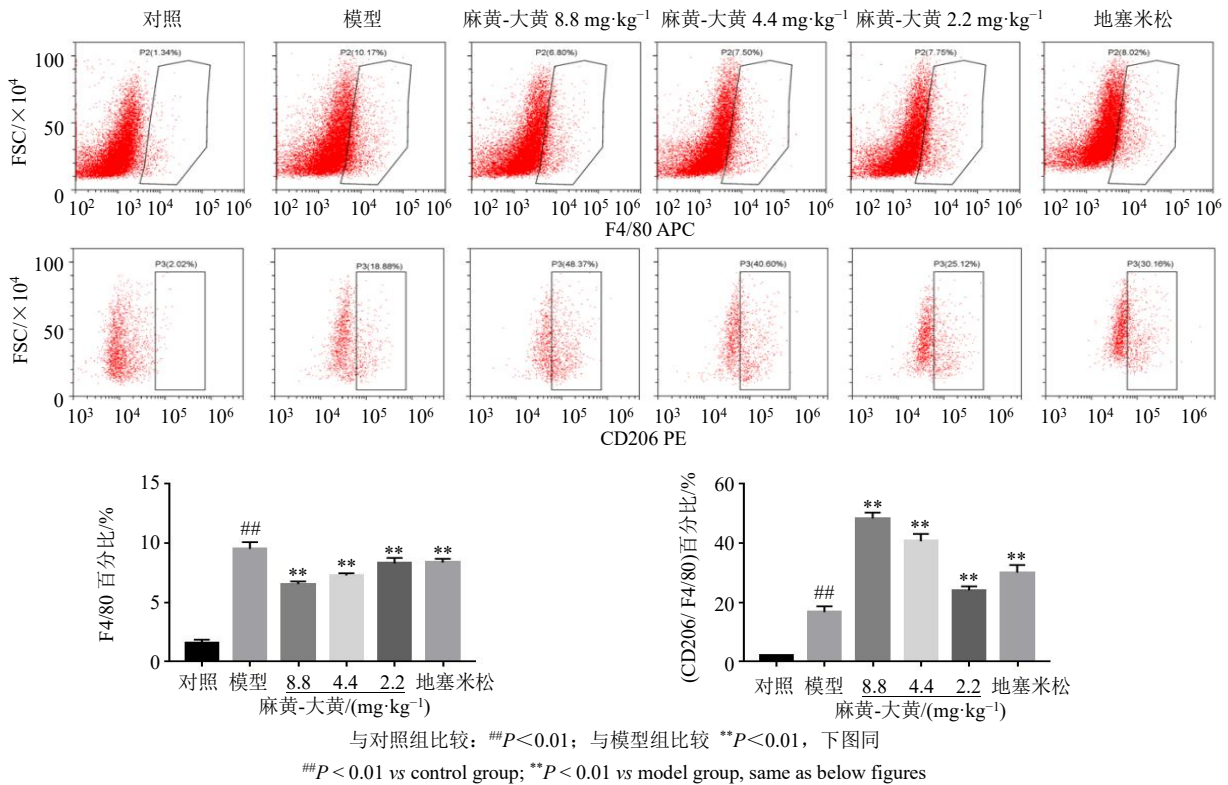


图4 各组大鼠肺组织 F4/80 标记的肺泡巨噬细胞和 CD206 标记的 M2 肺泡巨噬细胞百分比变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
Fig. 4 Percentage change of F4/80-labeled alveolar macrophages and CD206-labeled M2 alveolar macrophages in lung tissue of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

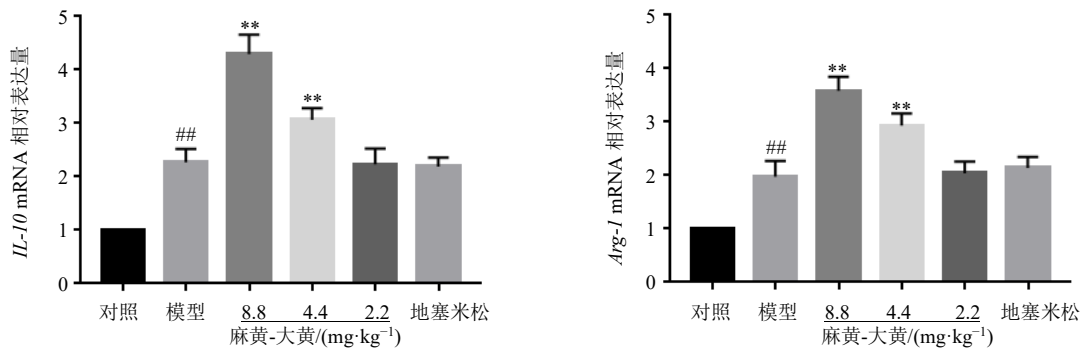


图5 各组大鼠肺组织 IL-10 和 Arg-1 mRNA 表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
Fig. 5 IL-10 and Arg-1 mRNA expressions in lung tissues of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

噬细胞向肺组织迁移, 并启动免疫反应。流式细胞术检测发现大鼠 ip LPS 后, 肺组织 F4/80 标记的肺泡巨噬细胞数量显著增多, 同时病理组织学结果证实, 肺组织发生了严重的损伤, 这与文献报道结果一致<sup>[14]</sup>。肺泡巨噬细胞在吞噬入侵肺组织病原微生物的同时也分泌多种细胞因子, 通过不同途径启动免疫炎症反应, 并调节着炎症反应的进程<sup>[15]</sup>。当病原微生物入侵时, 肺泡巨噬细胞向 M1 极化, 在吞噬入侵者的同时, 释放炎症因子, 促发炎症反应, 从而激活机体免疫系统以尽快应对外来的刺激。然

而肺泡巨噬细胞过度的 M1 极化则导致炎症反应加剧, 造成肺组织损伤, 由此看来, 肺泡巨噬细胞似乎是导致 ALI 的罪魁祸首。然而, 肺泡巨噬细胞会根据环境的改变而转换其极化表型, 当病原微生物被逐渐清除, 肺泡巨噬细胞则逐渐向 M2 型极化, 释放抑炎因子, 抑制炎症反应, 促进受损组织修复。本研究结果表明, 大鼠 ip LPS 后, F4/80 标记的肺泡巨噬细胞增多的同时, CD206 标记的 M2 型巨噬细胞的表达也部分增强, 但由于 M2 型巨噬细胞的数量有限, 仍不能有效地抑制炎症反应, 因此, 促

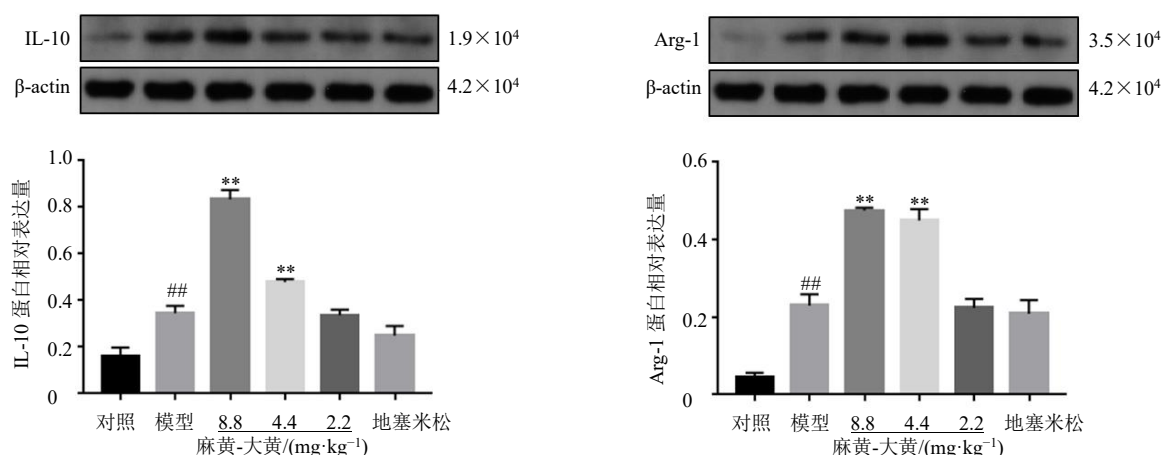


图 6 各组大鼠肺组织 IL-10 和 Arg-1 蛋白表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 6 IL-10 and Arg-1 protein expressions in lung tissues of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

进肺泡巨噬细胞的 M2 极化是对抗 M1 极化, 抑制炎症反应的有效途径之一。

肺肠合治法是中医临床治疗肺系疾病的经典治法, 通常采用宣肺与通肠药物配伍, 针对 ALI 初期肺热腑实证疗效显著<sup>[16-17]</sup>。本课题组前期研究肺肠合治法治疗 ALI 的作用机制时, 发现体现肺肠合治的麻黄汤和大承气汤联合应用具有显著的抑制炎症反应、改善肺水肿的作用<sup>[18-19]</sup>。麻黄、大黄分别是麻黄汤和大承气汤中的君药, 2 药根据《方剂学》麻黄汤和大承气汤中用量分别为 9、12 g<sup>[20]</sup>, 故本研究选用麻黄-大黄药对依照前期药物剂量比 3:4 来探索其对 ALI 大鼠的治疗作用。结果发现麻黄-大黄药对及地塞米松均可明显改善 ALI 大鼠的肺组织损伤, 抑制炎症细胞浸润, 减少肺泡巨噬细胞活化, 改善间质水肿和肺组织结构紊乱等病理状态。免疫组化和流式细胞术检测结果均证实麻黄-大黄药对能抑制肺泡巨噬细胞的活化并促进其向 M2 型极化。

IL-10 和 Arg-1 同属于 M2 型巨噬细胞释放的细胞因子, 因此也被用来作为 M2 巨噬细胞的标记物<sup>[21]</sup>。IL-10 是一种多效性细胞因子, 可以在多种类型细胞中发挥免疫抑制或免疫刺激的作用。在炎症反应方面, IL-10 能通过下调单核细胞表面主要组织相容性抗原 II 的表达, 降低其抗原呈递作用, 下调 T 淋巴细胞活性, 抑制炎症细胞的激活、迁移和黏附; 同时 IL-10 也能抑制炎症因子的合成与释放, 内源性与外源性 IL-10 均能在转录水平强烈抑制 IL-1、IL-6、IL-8、肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、粒-巨噬细胞集落刺激因子和粒细胞集落刺激因子的合成, 从而起到抗炎的作用<sup>[22]</sup>。Arg-1 可促使精氨酸降解为脯氨酸, 而

脯氨酸是胶原蛋白合成的基础物质, 在促进损伤肺组织修复方面发挥了重要的作用<sup>[23]</sup>。免疫荧光双标结果证实, 麻黄-大黄药对在促进肺泡巨噬细胞 M2 极化的同时, 还能促进 IL-10 的表达, 且 IL-10 与 CD206 呈共表达, 这一结果证实 IL-10 的增多与 AM 的 M2 极化相关, 随后的 qRT-PCR 和 Western blotting 检测结果证实, 麻黄-大黄药对能提高肺组织 IL-10 和 Arg-1 mRNA 和蛋白表达水平。

本研究结果显示, 麻黄-大黄药对可改善 ALI 大鼠肺组织炎症损伤, 减少肺泡巨噬细胞的活化, 同时促进肺泡巨噬细胞向 M2 抗炎表型极化, 促进抗炎因子 IL-10 和组织修复因子 Arg-1 的激活与释放。本研究发现地塞米松虽然能部分改善 ALI 大鼠肺组织病理变化, 但对肺泡巨噬细胞 M2 极化没有明显的影响, 实验研究证实将含有地塞米松的脂质体递送到炎症部位的巨噬细胞中, 会抑制纤维化肺组织中肺泡巨噬细胞的 M2 极化, 降低肺组织中 IL-10 和 Arg-1 水平<sup>[24]</sup>。在急性炎症发生时, 为了应对炎症反应的加剧, 在巨噬细胞 M1 极化增强的同时, M2 极化也会适应性的增强, 以应对炎症反应<sup>[25]</sup>。因此地塞米松在抑制巨噬细胞 M1 极化, 减轻炎症反应的同时也抑制了肺泡巨噬细胞 M2 极化。本研究仅观察了麻黄-大黄对肺泡巨噬细胞 M2 极化的影响, 其促进肺泡巨噬细胞的 M2 极化机制还需要进一步研究。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Cleary S J, Kwaan N, Tian J J, *et al.* Complement activation on endothelium initiates antibody-mediated

- acute lung injury [J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(11): 5909-5923.
- [2] 李子轲, 赵建, 丁日高. 肺泡巨噬细胞与急性肺损伤发病机制研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2018, 45(5): 347-352.
- [3] Song C, Li H T, Li Y, *et al.* NETs promote ALI/ARDS inflammation by regulating alveolar macrophage polarization [J]. *Exp Cell Res*, 2019, 382(2): 111486.
- [4] 黄湘平, 谭超超. 巨噬细胞 M1/M2 极化在急性肺损伤病理生理中的研究进展 [J]. 实用休克杂志: 中英文, 2021, 5(1): 41-45.
- [5] 谢钦子, 钟彩婷, 纪树亮, 等. 基于网络药理学及分子对接技术探讨化湿败毒方治疗新型冠状病毒肺炎的分子机制 [J]. 中药药理与临床, 2020, 36(3): 28-35.
- [6] 刘闰平, 葛俊德, 钟颖, 等. 基于干预细胞因子风暴文献挖掘的中医药治疗重症新型冠状病毒肺炎探讨 [J]. 中草药, 2020, 51(5): 1096-1105.
- [7] 崔雯雯, 金鑫, 张彦芬, 等. 连花清瘟胶囊对脂多糖致急性肺损伤小鼠 IKK/I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B 信号通路的影响 [J]. 中成药, 2015, 37(5): 953-958.
- [8] Kuchta K, Cameron S, Lee M, *et al.* Which East Asian herbal medicines can decrease viral infections? [J]. *Phytochem Rev*, 2021: 1-19.
- [9] 朱培, 闫东梅, 郑伟. 大黄酚通过抑制巨噬细胞的 TNF- $\alpha$  从而改善 LPS 诱导的小鼠炎症反应 [J]. 中国实验诊断学, 2021, 25(1): 98-101.
- [10] 陈欧, 李国勇, 刘爱红, 等. 网络药理学预测麻黄治疗哮喘的抗炎作用机制 [J]. 山东大学学报: 医学版, 2019, 57(1): 55-61.
- [11] 赵玉升, 李伟洋, 曹天佑, 等. 基于纳米技术研究葶苈子炭治疗急性肺损伤的物质基础及其机制 [J]. 中草药, 2021, 52(20): 6188-6196.
- [12] Group R C, Horby P, Lim W S, *et al.* Dexamethasone in hospitalized patients with Covid-19 [J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(8): 693-704.
- [13] Yang J W, Mao B, Tao R J, *et al.* Corticosteroids alleviate lipopolysaccharide-induced inflammation and lung injury via inhibiting NLRP3-inflammasome activation [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(21): 12716-12725.
- [14] Ye C, Li H T, Bao M W, *et al.* Alveolar macrophage-derived exosomes modulate severity and outcome of acute lung injury [J]. *Aging*, 2020, 12(7): 6120-6128.
- [15] Kumar V. Pulmonary innate immune response determines the outcome of inflammation during pneumonia and sepsis-associated acute lung injury [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1722.
- [16] 王馨培, 王子玉, 傅强, 等. 基于网络药理学和多中心临床数据的清肺承气汤治疗腹腔感染所致急性呼吸窘迫综合征的作用机制研究 [J]. 中草药, 2021, 52(2): 437-446.
- [17] 徐彩超, 刘新桥, 刘恩顺, 等. “肺与大肠相表里”理论指导治疗 ALI/ARDS 的临床疗效报告 [J]. 天津中医药大学学报, 2011, 30(3): 141-143.
- [18] 王文霸, 闫曙光, 李京涛, 等. 基于 VIP/cAMP/PKA/AQPs 信号通路研究肺肠合治法减轻肺水肿治疗急性肺损伤的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(8): 101-107.
- [19] 王瑞哲, 寇育乐, 贺宏伟, 等. 肺肠合治法对 LPS 诱导急性肺损伤大鼠 NF- $\kappa$ B 炎症通路和巨噬细胞极化的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(8): 93-100.
- [20] 李冀. 方剂学 [M]. 第 2 版. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 23, 47.
- [21] Liu R, Hao D L, Xu W Y, *et al.*  $\beta$ -Sitosterol modulates macrophage polarization and attenuates rheumatoid inflammation in mice [J]. *Pharm Biol*, 2019, 57(1): 161-168.
- [22] Vega-Galaviz D, Vecchy-Tenorio G D, Alcántara-Suárez R, *et al.* M2 macrophage immunotherapy abolishes glucose intolerance by increasing IL-10 expression and AKT activation [J]. *Immunotherapy*, 2020, 12(1): 9-24.
- [23] Witte M B, Barbul A. Arginine physiology and its implication for wound healing [J]. *Wound Repair Regen*, 2003, 11(6): 419-423.
- [24] Sang X Q, Wang Y Y, Xue Z F, *et al.* Macrophage-targeted lung delivery of dexamethasone improves pulmonary fibrosis therapy via regulating the immune microenvironment [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 613907.
- [25] Chandrasekaran P, Mosser D M. Macrophages and the recovery from acute and chronic inflammation [J]. *Annu Rev Physiol*, 2017, 79: 567-592.

[责任编辑 李亚楠]